

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 02-009378

(43)Date of publication of application : 12.01.1990

(51)Int.Cl.

C12N 15/87

A01H 1/00

A01H 5/00

C07H 21/04

(21)Application number : 01-067757

(71)Applicant : IMPERIAL CHEM IND PLC <ICI>

(22)Date of filing : 22.03.1989

(72)Inventor : DUNWELL JAMES MARTIN

(30)Priority

Priority number : 88 8806643 Priority date : 21.03.1988 Priority country : GB

(54) PRODUCTION OF TRANSFORMED PLANT AND TRANSFORMED PLANT

(57)Abstract:

PURPOSE: To develop a technique generally applicable to plant transformation by perforating the cell wall of a plant embryo with laser pulse to inject the embryo with a genetic substance.

CONSTITUTION: First, an embryo from an untransformed plant, pref. an embryo having up to 20 cells, is suspended in an aqueous solution containing a DNA intended to transfer into the embryo. Subsequently, the focus of a laser unit, pref. that of a solid-state laser unit, is brought to one of the cells, followed by laser excitation to effect perforation of a cell wall. The appropriate dimension of the resulting perforation is 10-100 nm, pulse application time being pref. 10-15 ns, pulse energy pref. 1-10 mJ. After laser treatment, the system is incubated at 15-30° C for 1-30 min and the DNA is transferred via the perforation into the embryo. When a dye with high extinction coefficient is incorporated in the above aqueous solution, energy transmission to the plant cell wall is improved.

⑬ Int.Cl.³

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成2年(1990)1月12日

C 12 N 15/87
A 01 H 1/00
C 07 H 21/04

A 7804-2B
A 7804-2B
B 7417-4C

審査請求 未請求 請求項の数 10 (全7頁)

⑮ 発明の名称 形質転換植物の製造方法及び形質転換された植物

⑯ 特 願 平1-67757

⑰ 出 願 平1(1989)3月22日

優先権主張 ⑱ 1988年3月21日 ⑲ イギリス(CB) ⑳ 8806643

⑳ 発 明 者 ジェームス・マーチ インベリアル・ケミカル・インダストリーズ・ピーエルシー
ン・ダンウエル イギリス国・パークシャー・ブラックネル・ジャロツツ・ヒル・リサーチ・ステーション(番地その他表示なし)
⑲ 出 願 人 インベリアル・ケミカル・インダストリーズ・ピーエルシー イギリス国・ロンドン・エス・ダブリュ・1・ビー・3・ジェイ・エフ・ミルバンク・インベリアル・ケミカル・ハウス(番地その他表示なし)
㉑ 代 理 人 弁理士 八木田 茂 外2名

明 細 書

1. 発明の名称

形質転換植物の製造方法及び形質転換された植物

2. 特許請求の範囲

1. 形質転換されてない植物から採取した胚の細胞壁に孔を形成し、ついでこの孔を経て胚中に、遺伝子物質を導入することからなる形質転換植物の製造方法において、上記孔をレーザーパルスにより形成させることを特徴とする、形質転換植物の製造方法。――

2. 遺伝子物質は DNAである請求項1記載の方法。

3. DNA は非相同の遺伝子をコードするものである請求項2記載の方法。

4. レーザーはUVレーザーである。請求項1～3のいずれかに記載の方法。

5. エキシマーレーザーを使用する。請求項1～4のいずれかに記載の方法。

6. レーザーはソリッドステートレーザーある。

請求項1～3のいずれかに記載の方法。

7. 胚は1～約200個の細胞を含有しているものである請求項1～6のいずれかに記載の方法。

8. 胚は接合子性の胚の全体である。請求項7記載の方法。

9. 胚は体細胞性の胚である。請求項8記載の方法。

10. 請求項1～9に記載の方法によって処理された胚の後代として得られる、遺伝学的に形質転換された植物。

3. 発明の詳細な説明

本発明は遺伝子操作に関し、特に、所望の遺伝子を包含しかつ表現すなわち発現する、新規な植物を提供することを目的とする植物の遺伝子操作に関する。かかる発現されるべき遺伝子はその植物種中に普通に存在して該植物中で発現されている種類のものであるか、又は、その植物の種又は植物の属にとって外来種である遺伝子であり得るし、また例えば、通常、植物界には全く存在せず又は表現されてない遺伝子であり得る。

ゲノムを処理してその中に新しいDNAを挿入することにより現存する生物から新しい生物を製造する方法は、形質転換と一般に呼ばれている。広い汎用性を有するかつ信頼性のある植物の形質転換方法が長い間、求められている。植物の形質転換について種々の方法が提案されている；これらの方法として例えばアグロバクテリウム ツメファシエンシス (*Agrobacterium tumefaciens*) を使用する方法、粒子衝撃法 (particle bombardment)、エレクトロポレーション法 (electroporation) 及びマイクロ注入法が挙げられる。しかしながら、これらの方法はいずれも広い汎用性を有する、かつ信頼性のある方法を提供するものではない。例えば、アグロバクテリウム ツメファシエンシス (Tiプラスミド) を使用する方法は、通常、広葉樹植物を用いた場合しか実施することができない。粒子衝撃法、エレクトロポレーション法及びマイクロ注入法は特定の場合一つについて実施されているが、一般的な汎用性を有するものとは考えられない。例えば従来、極めて少数の単子葉植物しか形

質転換が成功しているに過ぎない。非常に多くの種類の経済的に重要な作物 (例えば小麦、トウモロコシ、大豆、及び稲) は単子葉植物であるという理由から、単子葉植物についての信頼性のある形質転換法は非常に興味のあるもので開発が望まれているのである。

本発明は植物の形質転換に汎用的に適用し得る方法を提供するものである。本発明は、原則的には、任意、所望のDNAを任意の植物ゲノムに導入させるのに使用することができ、従って、非常に広範囲の、重要な利用可能な用途を有するものである。

従って本発明によれば、形質転換されてない植物から採取した胚の細胞壁に孔を形成しつつこの孔を経て胚中に遺伝子物質を導入することからなる形質転換植物の製造方法において、上記孔をレーザーパルスにより形成させることを特徴とする。形質転換植物の製造方法が提供される。

動物細胞の形質転換 (トランスフェクション) は上記したごとき方法で行われたことがあり

(Tsukakoshi, H. 等, *Appl. phys.*, **8**, 33, 135-140, 1984; EPA 137504 参照) としてこの目的に使用される装置は日立製作所で製造されている。これと同様の装置も製造されており (Viegand 等, *J. Cell Sci.*, **88**, 145-149, 1987 参照)。主として、植物組織及び細胞についての予備的な実験に使用され (Weber 等, *plant cell tissue and Organ Culture*, **12**, 219-222, 1988 参照)。またオルガネラについての実験 (Weber, G., *Eur. J. Cell. Biol.*, **43**, 58, 1987; 西独特許出願第3707111A 号参照) においても使用されているが、上記の方法によって植物の胚を形質転換することは、本発明者の知る限りにおいて、未だ提案されていない。このことは、植物を形質転換するための信頼性のある方法を求める広い要望が永らくあったことを考えると特に注目を行うことである。

本明細書中で使用される“胚”という用語には、接合体 (zygote)、又は胚形成の過程で接合体から誘導される、2~200個の細胞を有する胚、又はかかる胚の一部を形成する、任意の1個又はそれ以

上の細胞が包含される。また、小胞子から誘導される胚、及び200個までの細胞を有する体細胞性 (somatic) の胚も包含される。若い (早期の) 接合子性の胚 (zygotic embryo) の全体、特に約20個までの細胞を有する胚を使用することが好ましい。

本発明の方法は、通常、適当な胚を、導入したいと希望するDNAを含有する溶液、典型的には水溶液中に懸濁させることにより行い得る。ついでレーザー装置の焦点を胚の細胞の1つ上に合わせ、そしてレーザーを駆動して細胞壁中に孔を形成させる。孔の寸法は変動させ得るが、細胞の寸法と比較して余り大きいものであってはならない。実際には、適当な孔の寸法は処理すべき細胞の寸法によって異なるであろうが、多くの場合、約5~約500ナノメートル (nm) の直径を有するであろう。ある目的については10~100nmの直径が適当であろう。

パルスの印加時間は5~20ナノセカンド (ns) であることが好都合であり、好ましくは10~15nsである。パルスエネルギーは、典型的には、1~10

ミリジュールの範囲に調整する。細胞壁とプラズマ膜の両方に孔を貫通させるためには2つ以上のパルスが必要であることもある。各細胞の胚中に存在する可能な限り多くの数の細胞に遺伝物質を注入することが好ましい。各々の細胞の多くの場所に孔を形成させることが有利であり得る。

原則的には、適度に微小な焦点に集中させることができる任意のレーザー装置を本発明の方法で使用し得る。しかしながら、哺乳動物細胞のレーザー・マイクロインジェクション(microinjection)に利用可能な装置がすでに存在している。その例は日立製作所製の日立レーザーマイクロインジェクターであり、Tsukakoshi等により、雑誌「*Appl. Phys.*」8, 35, 135-140, (1984)及びEPA 137054号中に記載されている。本発明の方法で使用するのに有用であり得る他のレーザー装置は前記のViegand等の報文中に記載されている。Viegand等は210~970nmの間で変調し得る色素レーザー(dye laser)を供給するためにエキシマー(eximer)レーザーを使用している。

行われる。植物毒性を有する染料は使用すべきではない；その理由はこの染料は処理された細胞の生存能力(viability)に有害な影響を与えるからである。

処理に用いるために、胚は植物の胚果(caryopsis)から切開(dissection)により調製することが好都合である。寸法の最小の胚については、胚果の端部を無菌のパラフィン油の油滴中で切開するNorstogの方法(*American J. Bot.*, 52, 538-546, 1965参照)を使用することが好都合である。切開により単離された胚を、毛管を用いて油滴中に浮上させ、ついで栄養培地中に移す。この方法においては切開中の胚の乾燥が回避される。胚果の切開は解剖用又は倒立式の顕微鏡を用いて行い得る。胚は半透明であるので、暗視野照明法、Nomarsky(DIC)照明法又は相間対比(phase contrast)照明法を使用することが有利である。

レーザー処理を行った後、DNAをその溶液から穿孔後の細胞中に拡散、侵入させるのに十分な時間、胚をDNA溶液中でインキュベートする。イン

好ましい形式のレーザーの一つはソリッドステートレーザーである。かかるレーザーはパルスの幅、パルスの形及びパルスの出力の制御が容易であるという利点を有する。かかるレーザーの典型的な波長は780nm又は830nmの赤外線領域にある；しかしながら、可視波長でレーザー光線が発生するか又は周波数(frequency)が2倍にされるソリッドステートレーザーも使用し得る。

本発明の別の特徴は、胚を懸濁させた溶液中に、選択されたレーザー光線の波長において高い吸光係数を有する染料を配合することである。780又は830nmのソリッドステートレーザーについては80,000の吸光係数を有するICI S116510インフラレッドダイ又は30,000の吸光係数を有するブロードバンドICI S109564のごとき水溶性染料を使用し得る。細胞壁、例えば細胞壁中のセルロース又はプラズマ膜と結合する染料を使用することが好ましい。この染料併用方法を行うことによって、植物細胞壁へのエネルギーの伝達が改善され、従って、細胞壁の孔の形成がより正確にかつ迅速に

キュベート時間は例えば数秒〜数時間までの非常に広い範囲で変動させ得る。通常、5秒〜2時間、特に1〜30分が適当である。かかるインキュベーションは通常、0〜40℃の温度、特に15〜30℃の温度、好都合な温度として室温で行われる。

胚を懸濁させるDNA溶液は細胞中に導入することを希望するDNA約0.001〜2重量%と他の成分とを含有する。かかる成分は例えば、正確な浸透圧の平衡化(osmotic balance)を促進するための不活性塩類、細胞栄養物又は他の添加剤であり得る。導入することを希望するDNAはプラスミド又は好ましくは線状DNAの形であり得るが、導入すべきDNAは二重鎖DNAであるのが普通である。導入すべきDNAの長さは、塩基数が数千ベースのものから、数百キロベース(kilobases)のものであり得る。典型的には、導入すべきDNAは、会合(associated)した植物に特異な制御配列(plant-specific control sequence)を有する非相同性の遺伝子(heterologous gene)の全体を含むものになるのであって、しかもこの遺伝子は形質転換されるべき植物中で発現

され得るものであろう。DNA に代るものとして、細胞中に導入されるべき遺伝子物質は、細胞のゲノムを変性する力を有するRNA(例えばレトロウイルス型のRNA)であり得る。

導入されるべきDNA は下記のタイプの物質の1種又はそれ以上からなるか又はこれを包含している：

1. 形質転換されるべき植物に新しい性質を付与する新しい遺伝子又は別のDNA配列。このDNAは、その機能が構造的であるか、調節的であるか又は触媒的であり得るRNA 又は蛋白質生成物をコード(encode)し得るものである。この方法で植物中に導入し得る遺伝子としては殺虫性蛋白質を産生するための遺伝子(例えば、バシルス スリンギエンシス (*Bacillus thuringiensis*) 中に見出される殺虫性の内生毒素を生ずる遺伝子)及び除草剤耐性を付与する遺伝子が挙げられる。

2. 導入された制御配列により発現を調節すべき遺伝子配列から適当な距離に位置しておりかつ該遺伝子配列に対して適当な配向を有する前記の

制御配列。この制御配列は構成的成分としての転写プロモーター(constructive promoter)を包含するものであるか、又は、病原体による攻撃、創傷等に応答して出る、化学的、環境的、一時的又は発現性(developmental)である内因性又は外因性のシグナル(信号)に対して応答性のものである制御配列であり得る。

3. 積極的な選別手法により形質転換体の同定及び検出を可能にする選択(selectable)マーカー遺伝子。典型例としては、この遺伝子は、カナマイシン又はハイグロマイシンのとき適当な抗生物質に対して、形質転換後の植物が選択した耐性をコードする遺伝子であろう。ある環境下では、この目的に対して新しい遺伝子(前記1に記載の如き)を使用することが適当であり得る。遺伝子操作で形成された構築物(construct)を含有する原核細胞の同定及び検出を可能にする他の選択マーカー遺伝子も望ましいものであり得る。

4. 標的(ターゲット)ゲノムに追加的な相同性(homology)を提供する1種又はそれ以上の配列。

かかる配列は相同的な組換えの頻度の増加を行うことができ、従って、形質転換体の安定性の増大を提供し得るものである。この種の配列は、組換え性(recombinogenic)の配列、すなわち、標的ゲノムとの組換えを積極的に促進する配列を包含することも有用である。

5. 遺伝子操作で形成された構築物が適当なバクテリア宿主中で増殖させるのに必要な配列、例えば大腸菌中で機能できる複製起点の配列。

6. 植物細胞中における導入されたDNA の複製を開始させることのできる植物性の複製起点DNA配列(又はARS-自立複製性配列)。この複製起点は標的植物細胞中の遺伝子操作構築物の複製(copy)の数を増加させそれによって安定な形質転換事象が行われる確率性(probability)を増大させる。

本法で行われたレーザー処理とインキュベーションを行った後、得られた胚又はこれから誘導された細胞を培養して完全な植物の本体を生ぜしめる。個々の胚を別々に成熟させて単独の独立した植物を生ぜしめるか、又は個々の胚をクローンす

ることにより、多数の同一の細胞を生ぜしめ、そしてそれら細胞の各々から形質転換植物を生ぜしめ得る。本発明の好ましい実施態様においては、Schweiger等の方法(*Theor. Appl. Genet.*, 73, 769-783, 1987参照)に従って、胚油中で被覆されている液滴中で胚を培養するか又はSpangenberg, G.等の方法(*Physiol. plant.*, 66, 1-8, 1986参照)に従って、ポリカーボネート製マイクロカルチャー室内で100~1000ナノリッターの液滴中で培養するかして微小液滴内で胚を培養する(これらの文献の記載は本明細書中で参照されている)。培養装置系の幾つかの要件はNeuhaus等により説明されている(*Theor. Appl. Genet.*, 75, 30-36, 1987参照)。トウモロコシの胚の培養に有用な培地はBurghartova, K. 及びTupy, J.により*Biol. Plant.*, 22, 57-64, (1980)に記載されている。

前記したごとく本発明は非常に広範囲の植物に適用し得る。形質転換し得る植物は飼育用植物又は作物植物、高木及び低木である。形質転換し得る双子葉植物としてはトマト、タバコ、テンサイ、

アブラナ、キャベツ及び関連するブラシカ(*Brassica*)種、ジャガイモ等が挙げられる。形質転換し得る単子葉植物としてはトマネギ、草類例えば蕎麦用及び飼料用草、サトウキビ及び穀類作物例えば小麦、大麦、オート麦、ゴマ及び稲のごとき小穀類穀類及びコーン又はトウモロコシが挙げられる。

以下においては実施例及び図面を参照して本発明を更に説明する。

実施例

1. プラスミドDNAの構築

胚細胞に挿入用の遺伝子操作用構築物(construct)はカリフラワーウイルス(CaMV)プロモーター、トウモロコシのアルコール脱水和酵素(ADH)遺伝子の第1イントロン、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ(NPTII)遺伝子及びこれに続くノバリンシンターゼ(NOS)ターミネーターからなる。この構築物はトウモロコシプロトプラストの安定な形質転換に使用される構築物(Fromm等、*Nature*, **319**, 791-793, 1986参照)の変形物である(Callie, J. 等、*Genes and Development*, **1**, 1183-1200,

参照)。胚が細胞数10~20個の寸法になったとき、胚(ear)を収穫した。この時期は受粉後3~5日間のうちであり、そしてこの時期は各々の遺伝子型について正確に調整し得る。個々の胚果の殺菌と単離はGengenbach, B. G.の方法(*Planta* **134**: 91-93, 1977; *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plant*, I.K.Vasil編集, pp276-282, 1984参照)又はKing, P. 及びShimamoto, K.の方法(*Handbook of Plant Cell Culture*, Vol.2, V. R. Sharp, D. A. Evans, P. V. Ammirato及び Y. Yamada編集, pp60-61, 1984参照)に従って行った。

4. 胚の調製

個々の胚果を無菌条件下で切開し(King, P. 及びShimamoto, K.の上記文献参照)、そして胚はこれをシリコンチューブに連結された手動吸引上げ式マイクロキャピラリー中に吸引上げることにより取出して単離した(Neuhaus, G. 等、*Theor. Appl. Genet.*, **75**, 30-36, 1987参照)。この操作は解剖用顕微鏡を使用して行った。

5. 胚への注入

1987参照)。この構築物はカナマイシン耐性マーカーとして作用する。この構築物は既知の雄化法に従って、適当な制限酵素を用いて特定の制限部位を切断させ、次いで、再環化を防止するためプラント末端を形成させることにより調製される。

2. 植物の生長

選択された遺伝子型(genotype)のトウモロコシ植物をConvicon又はVeissによって製造された形式の生育室内で制御された環境下で生長させた。露光時間、光の強さ及び温度条件は、植物が健全に生長しかつ雄性及び雌性の花序(inflorescence)の正常な発生が行われるように設定した(露光時間10時間、光の強さ600 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{秒}$ 、昼間28℃/夜間20℃)。

3. 胚果の単離

偶発的な受粉を防止するため、発育中の穂(silk)に袋を被せた。接合子性の胚の発育時期全体にわたって緻密な受粉の管理を行うために、人工受粉を行った(Neuffer, M. G., *Maize for Biological Research*, Ed. V. F. Sheridan, pp19-30, 1982

胚への注入を行うために、前記1の操作で得たDNA(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)を含有するかつソルビトール(0.4M)によって提供される高い浸透圧を有する緩衝液中に胚を移した。注入手段として、動物細胞用に当初設計されたレーザー利用装置(Taukakoshi, M. 等、*App. Phys. B.*, **35**, 135-140, 1984参照)であって、そしてより最近では種々の植物細胞にも使用されている(Viegand, の前記文献; Weber G. 等の前記1985年の文献参照)、レーザー利用装置を使用した。必要な型式の市販の装置は日立製作所で製造されており、日立レーザーマイクロインジェクターと呼ばれている。パルス時間は10nsである。胚を構成する細胞の各々にDNAの注入を行った。この際、胚は注入を行う間、保持ピペット中に保持しかつ回転させて、各々の細胞にレーザービームを当て照射した。この方法は添付図面に示されている。図中、10はトウモロコシ胚であり、11はレーザービームであり、12は保持ピペットであり、13はDNA含有緩衝液である。

6. 胚の培養

注入後、Norstog. Iにより、未成熟の大麥胚について開発された処方の培養液(*In vitro*, 8, 307-308, 1973参照)又はJensen, C. J. (Cell and Tissue Culture Techniques for Cereal Crop Improvement, Science press, Beijing, pp55-79, 1983参照)中に胚を移した。胚は鉱油により被覆された15~100n2の微小液滴中で、個々に培養した(Schweiger, H. G.等、*Theor. Appl. Genet.*, 73, 769-783, 1987参照)。微小液滴中で6~10日培養した後、胚をTerashiki培養基(Neuhaus, G., 等、*Theor. Appl. Genet.*, 75, 30-36, 1987参照)のウエル中に入れた前記と同一の培養液40 μ l中に移した。ついで発育しつつある胚(14~28日)を、アガロース又は“ゲルライト”(“Gelrite”)で固化させたかつシロ糖をより少ない含有量(30g/l)で含有する同様の培養液を含有するベトリ皿に移して、発芽を促進させた。ついで個々の幼苗(小植物)をガラス又はプラスチックチューブ中で、同様に無菌条件下で更に生長させた。

7. 植物の生長及び選別

約5~10cmの高さになったとき、幼苗植を堆肥中に移植しそして温室内で、当初、高湿度でかつ光線量の少ない条件下で生長させた。各々の幼苗は成熟するまで生長させそして注意しながら自己受粉させた。雑が外来の花粉で汚染される可能性を防止するために厳重な注意を行った。各々の植物からの穀粒(kernel)を慎重に収穫した。形質転換された穀粒の選別は、穀粒を殺菌しついで寒天又はゲルライトで固化させた Murashige及び Skoogの2倍希釈培地(*Physiol. Plant.*, 15, 473-497, 1962参照)上で発芽させることにより行った。葉の断片を各々の幼苗から取り出しそしてカナマイシン又はG418を含有する上記と同様の培養液中でインキュベートした。緑色が保持されていることはネオマイシンホスホトランスフェラーゼⅡが存在していることを示す。更に酵素活性の有無の直接的評価も組織断片について行った(Rolfs等、*Gene*, 39, 211-218, 1984; McDonnell等、*Plant Mol. Biol. Rep.*, 5, 380-386, 1987参照)。上記の試験のいずれか一方で正の反応を示す幼苗

体を保管して、その遺伝子の転移性(transgenic nature)をサザン blot(Southern blotting)により確認した。

4. 図面の簡単な説明

図面は本発明に従って細胞膜に孔を形成かつ遺伝物質を注入する方法を示す。

10…トウモロコシ胚、11…レーザービーム、
12…保持ピペット、13…DNA含有培養液。

図面の浄書(内容に変更なし)

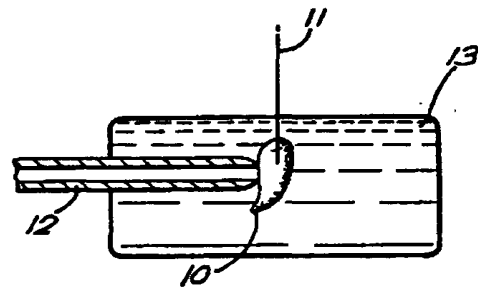


FIG. 1

手校補正 齒 (自見)

平成 1 年 5 月 11 日

特許庁長官 殿

1. 事件の表示

平成 1 年特許動第 87757 号

2. 発明の名称

形質転換植物の製造方法及び形質転換された植物

3. 補正をする例

事件との関係 特許出願人

住 所 イギリス国、ロンドン、エス、ダブリュ、1、ビー、
3・ウエイ・エフ、ミルバンク、インベリアル・
ケミカル・ハウス（番地その他表示なし）

名 称 インベリアル・ケミカル・インダストリーズ・
ピーエルシー

4. 代理人

〒105 住 所 東京都港区西新橋1丁目1番15号
物産ビル別館 西 (591)0261

(6645) 氏 名 八木田 茂



5. 補正の対象

圖 画

6. 修正の内容

別紙のとおり

(図面の内容に変更なし)

